

THESIS 1969
BONN

**ÜBER DEN ABBAU VON IMIDAZOLYLMILCHSÄURE
IM SÄUGETIERORGANISMUS**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von
ANDREW RICHARD AMAR
aus 
LIRA UGANDA

BONN 1969

ÜBER DEN ABBAU VON IMIDAZOLYLMILCHSÄURE IM SÄUGETIERORGANISMUS

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von
ANDREW RICHARD A M A R
aus
LIRA UGANDA

BONN 1969

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Bonn.

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Karl-Oskar Mosebach

Korreferent: Prof. Dr. Dr. W. Dirscherl

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Mai 1969

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der
Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Dirscherl

Druck: Rheinische Friedrich Wilhelms-Universität

B o n n

Dem Andenken meines Vaters gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153520_0146

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Einführung	5
Theoretischer Teil	6
A. Historisches	6
B. Stellung der Imidazolylmilchsäure im inter- mediären Stoffwechsel	11
C. Überblick über Erkrankungen mit anormalen Histidin-Stoffwechsel	14
Experimenteller Teil	
A. Methodik	16
1. Tiere und Injektionen	16
2. Standards	16
3. Herstellung von ¹⁴ C-Imidazolylmilch- säure	16
4. Aufarbeitung der Organe	16
5. Säulen- und papierchromatographische Ver- fahren	17
6. Bestimmung der Imidazolylmilchsäure in den Extrakten und in den Eluaten	18
7. Radioaktivitätsbestimmungen	19
8. a) Flüssige Szintillations-Spektrometrie	19
b) Radipapierchromatographie	20
B. Ergebnisse	21
1. In-vitro-Versuche	21
2. In-vivo-Versuche	27
C. Diskussion der Ergebnisse	
Zusammenfassung	44
Literaturverzeichnis	46-47

Theoretischer Teil

A. Historisches

Die Imidazolyl-(4 bzw. 5)-milchsäure (Abb.1) wurde erstmalig von Pyman (25) synthetisiert. Er ging hierbei von L-Histidin aus und setzte diese Verbindung mit Silbernitrit und Salzsäure um (Abb.2). Eine große Anzahl von Derivaten stellte Knoop her. (22)

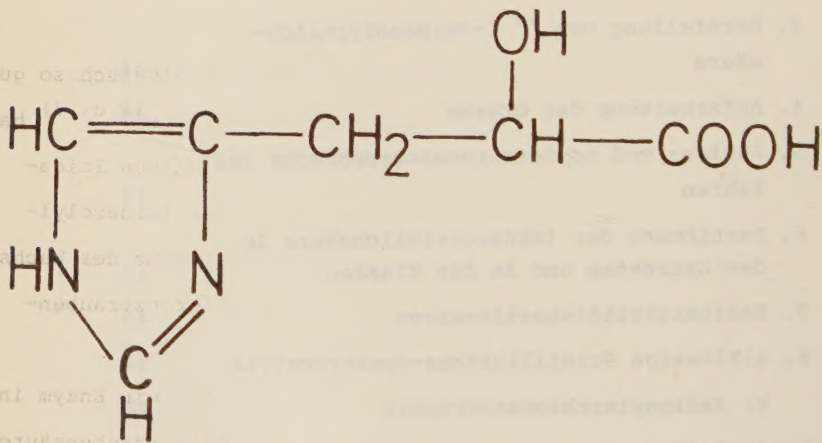


Abb. 1

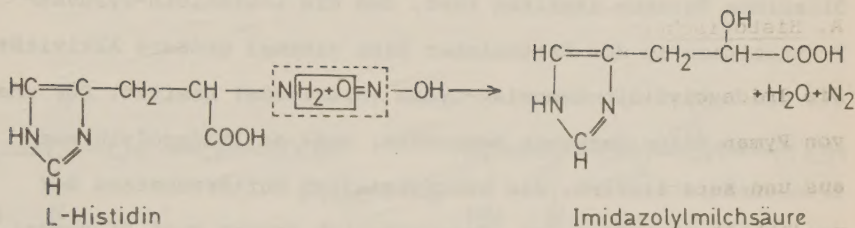


Abb.2

Bis 1958 ist über diese Säure klinisch und physiologisch so gut wie nichts bekannt geworden. Lediglich Cox und Ross^(6 u. 7) haben festgestellt, daß in jungen Histidinmangel-Ratten Imidazolylmilchsäure Histidin ersetzen kann. Gabe von Imidazolylmilchsäure an solche Tiere führte zur Wiederaufnahme des Wachstums. Es ist von Interesse, daß auch Imidazolylbrenztraubensäure L-Histidin ersetzen kann.⁽¹⁵⁾

Im Jahre 1958⁽²³⁾ wurden Lin und Mitarbeiter auf ein Enzym in Rattenleber aufmerksam, daß in Gegenwart von Brenztraubensäure L-Histidin in Imidazolylbrenztraubensäure umwandelt. Sie haben also eine L-Histidin-Pyruvat-Transaminase entdeckt.⁽⁶⁾ Imidazolylbrenztraubensäure wurde hierbei als Enol-Borat-Komplex abgefangen und spektographisch verfolgt.

Einige Jahre darauf ist diese L-Histidin-Pyruvat-Transaminase von Spolter und Baldrige⁽²⁷⁾ gründlich untersucht worden. Dieselben Autoren stellten fest, daß die L-Histidin-Pyruvat-Transaminase in der Rattenleber eine viermal größere Aktivität als die L-Histidin-Ammoniak-Lyase (Histidase) besitzt. Für uns ist dieses Enzym deswegen bedeutsam, weil es Imidazolylbrenztraubensäure liefert, die wahrscheinlich Muttersubstanz der Imidazolylmilchsäure ist. Grundsätzlich kommen zwei Bildungsweisen für Imidazolylmilchsäure in Frage:

(a) Hydrierung von Imidazolylbrenztraubensäure (Abb. 3)

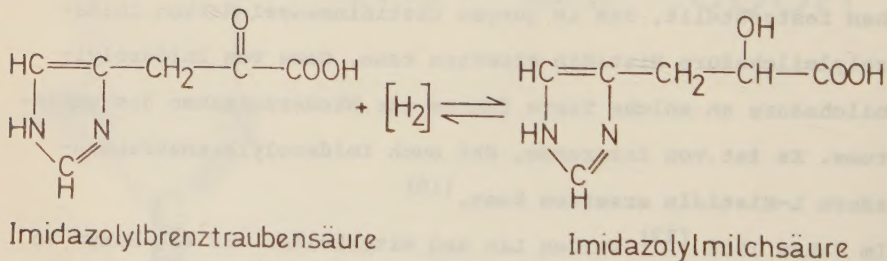


Abb. 3

(b) Hydratisierung von Urocaninsäure (Abb. 4)

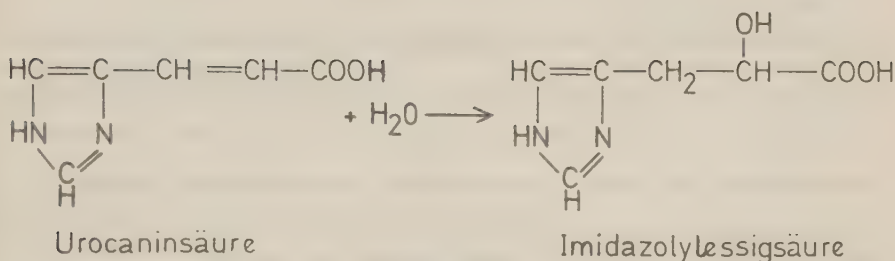


Abb. 4

Die Möglichkeit (b) ist sehr unwahrscheinlich, weil Urocaninsäure bei jungen L-Histidinmangel-Ratten L-Histidin nicht ersetzen kann. (6,7 u. 4) Es wurde erwähnt, daß Imidazolylmilchsäure dies kann. Wenn Urocaninsäure zu Imidazolylmilchsäure hydratisiert werden könnte, müßte auch Urocaninsäure L-Histidin ersetzen können.

Es bleibt vorläufig der Weg (a) diskutabel. Ob Imidazolylbrenztraubensäure zu Imidazolylmilchsäure reduziert werden kann, konnte bisher weder in vitro noch in vivo unmittelbar gezeigt werden. So wurde lediglich wiederholt festgestellt, daß nach Gabe von L-Histidin an Ratten Imidazolylbrenztraubensäure und Imidazolylmilchsäure gemeinsam im Urin ausgeschieden werden

(neben Imidazolylessigsäure und Imidazolypropionsäure). (27 u. 2)

Als normales Ausscheidungsprodukt, also auch ohne vorherige Gabe von L-Histidin oder einem anderem Imidazolderivat, wurde Imidazolylmilchsäure von Dubovsky und von uns unabhängig voneinander gefunden. (8)

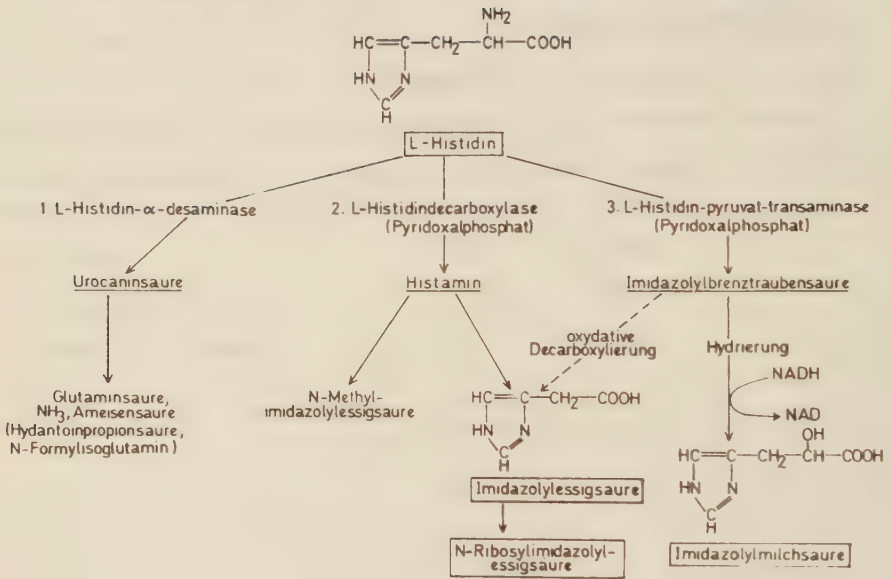
In unserer physikalisch-chemischen Abteilung des physiologisch-chemischen Instituts wurde während der beiden letzten Jahre ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von L-Histidin, Imidazolylmilchsäure und Imidazolylessigsäure ausgearbeitet. Bisher wurden folgende Werte gefunden (arithmetische Mittel $\pm$ Standardabweichungen) bei 11 männlichen gesunden Personen:

L-Histidin	321,9 $\pm$ 127 mg/l
Imidazolylmilchsäure	12,0 $\pm$ 6,7 mg/l
Imidazolylessigsäure	4,6 $\pm$ 2,9 mg/l

B) Stellung der Imidazolylmilchsäure im intermediären Stoffwechsel.

Um die Stellung der Imidazolylmilchsäure im intermediären Stoffwechsel zu charakterisieren, sei ein Überblick über den Gesamtstoffwechsel von L-Histidin nach modernster Erkenntnis gegeben.

(Abb. 5)



Die L-Histidin-Ammoniak-Lyase wurde schon im Jahre 1926 von Edlbacher entdeckt.⁽⁹⁾ Er nannte sie Histidase.

Wesentlicher Unterschied unserer Vorstellungen gegenüber früheren ist die Erkenntnis, daß die aus L-Histidin entstehende Urocaninsäure nicht hydrolytisch sondern durch einen intramolekulären Redox-Vorgang weiter abgebaut wird.

Eine moderne Darstellung dieses Histidinabbaus befindet sich bei Greenberg.⁽¹³⁾

Der Abbau von Histidin zu Histamin ist 1936 von Werle⁽²⁹⁾ entdeckt worden. Inzwischen sind sehr viele physiologisch- und klinisch-chemische Arbeiten über die Histidindecaboxylase angefertigt worden. Das Hauptinteresse an diesem Enzym liegt darin begründet, daß es das Gewebshormon Histamin bildet. Dieses Gewebshormon wird bekanntlich beim anaphylaktischen Schock und bei allergischen Erkrankungen als H-Substanz (Schockgift, Mediatorssubstanz) frei gesetzt.⁽¹⁷⁾

Neuerdings ist die Histidindecaboxylase auch aus anderen Gründen in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Nach Kahlson soll die Histidindecaboxylase-Aktivität in rasch wachsendem Gewebe (normalem und bösartigem) besonders hoch sein. Das ist mit wenigen Ausnahmen bisher bestätigt worden. Die Ursachen sind unbekannt.

Auf den 3. Abbauweg wurde schon im historischen Abschnitt eingegangen. Bei unserer Arbeit war von Interesse zu erfahren, ob aus Imidazolylmilchsäure auch Produkte entstehen können, die dem 1. und 2. Abbauweg angehören. So könnten theoretisch

durch Wasserabspaltung Urocaninsäure (1. Abbauweg) und durch Dehydrierung mit anschließender oxydativer Decarboxylierung Imidazolylessigsäure (2. Abbauweg) entstehen. Beides konnte nicht beobachtet werden.

C.) Überblick über Erkrankungen mit anormalem Histidin-Stoffwechsel.

Die ältesten Beobachtungen über eine anormale Ausscheidung von Imidazolderivaten stammen aus dem Jahre 1919.⁽¹²⁾ Furth beobachtete eine vermehrte Ausscheidung von Histidin im graviden Harn sowie im Harn bei Tuberkulose und Lebererkrankungen. Vorübergehend war man der Meinung, daß in der Schwangerschaft so viel Histidin ausgeschieden würde, daß der Histidinnachweis als Schwangerschaftstest verwendbar wäre.^(19 u. 20) Dieses Vorhaben mußte wegen der schwankenden Werte aufgegeben werden.⁽²⁸⁾ Bezüglich des 1. Abbauweges sind nur wenige Krankheiten bekannt geworden, bei denen anormale Mengen von Zwischenprodukten auftreten. Am bekanntesten ist die Formiminoglutaminacidurie geworden, die bestimmte megaloblastische Anämien begleitet.⁽¹⁶⁾ Demgegenüber sind über Anomalien im 2. Abbauweg Tausende von Arbeiten geschrieben worden, die hier nicht referiert werden können. Die Fülle der Arbeiten hängt mit der schon erwähnten Bedeutung des Histamins als Schockgift zusammen. Es seien nur die historisch ältesten Arbeiten erwähnt:

Eine vermehrte Freisetzung von Histamin beobachteten Cerqua⁽⁵⁾ 1936 erstmalig bei Urticaria, Katz⁽²¹⁾ 1940 bei Kontaktallergie, Obal⁽²⁴⁾ 1948 bei Heufieber und Schild⁽²⁶⁾ 1951 bei Asthma bronchiale.

Bei einer seltenen Kinderkrankheit, der Histidinämie, kommt es zu einer vermehrten Ausscheidung von Imidazolylmilchsäure und Imidazolylbrenztraubensäure. (3 u. 1)

Experimenteller Teil.

A. Methodik.

1. Tiere und Injektionen.

Als Versuchstiere wurden 35 Tage alte, nicht kastrierte männliche Sprague-Dawley-Ratten eingesetzt. Die Imidazolylmilchsäure wurde bei den in-vivo-Versuchen in neutralisierter, wässriger Lösung intraperitoneal injiziert. Die Größenordnung der injizierten Menge betrug 1 mg/2 g Ratte.

2. Standards.

Als Standards für die chromatographischen Arbeiten dienten Imidazol, (4 bzw. 5)-Hydroxymethylimidazol, (4 bzw. 5)-Imidazolformaldehyd, (4 bzw. 5)-Imidazolcarbonsäure, Histidin, Histamin, Urocaninsäure, Imidazolyl- (4 bzw. 5)-essigsäure und Imidazolyl- (4 bzw. 5)-milchsäure.

3. Herstellung von ^{14}C -Imidazolylmilchsäure.

(Ring-2- ^{14}C)L-Histidin wurde mit Silbernitrit in salzsaurer Lösung umgesetzt.⁽¹¹⁾ Die rohe Imidazolylmilchsäure wurde säulenchromatographisch gereinigt (Amberlite CG-120, H-Form, 200-400 mesh, 1 cm x 15 cm, Laufmittel 2N-HCl). Die markierte Imidazolylmilchsäure hatte eine spezifische Aktivität von 21 $\mu\text{C}/\text{mMol}$.

4. Aufarbeitung der Organe.

Bei in-vivo- und in-vitro-Versuchen wurden die Organe unmittelbar nach Dekapitierung der Tiere entnommen, ausgewogen, auf einem Mikrotom-Objekthalter mit Wasser bei -20° aufgefroren

und bei gleicher Temperatur in 20 μ Schnitte (Niere) zerlegt. Die Schnitte wurden mit einem Gefriermikrotom (Kryotom der Firma WKF, Gesellschaft für Elektrophysikalischen Apparatebau, Ernsthofen) angefertigt. Die Leber wurde bei 0° im Potter-Elvehjem-Apparat homogenisiert.

Die Schnitte oder Homogenate wurden in 4 ml Wasser aufgenommen. Die Gemische wurden 10 Minuten unter Rückfluß gekocht, um das Eiweiß auszufällen. Einfaches Ausfällen der Proteine durch zehnminütiges Kochen ist genügend schonend und brauchbar für die anschließenden chromatographischen Aufarbeitungen bzw. kolorimetrischen Bestimmungen.

5. Säulen- und papierchromatographische Verfahren.

Der Überstand wurde auf pH 8 gebracht und mit Dowex 1 x 8 (Acetatform, 200-400 mesh, 1 cm x 15 cm -Säule) chromatographiert. Es wurde eine 1. Fraktion mit 30 ml Wasser und eine 2. Fraktion mit 30 ml 1N-Essigsäure gewonnen. Die 1. Fraktion enthielt die basischen und neutralen Metabolite, die 2. Fraktion die Säuren. Zur Kontrolle wurde abschließend mit 4 N-Essigsäure eluiert; doch wurden in dieser Fraktion niemals Metabolite gefunden. Die Fraktionen wurden eingedampft und für die Papierchromatographie in 1,5 ml 0,1N-HCl aufgenommen. Als papierchromatographische Systeme dienten die in der Imidazolchemie bewährten Systeme Butanol/Wasser/Eisessig 4:5:1 (Partidge-Gemisch) und Propanol/Ammoniak/Wasser 8:1:1 (Laufzeit 20-24 Stunden, absteigende Chromatographie, Papier von Schleicher und Schüll Nr. 2043 b mittelglatt).

Nach Trocknung wurden die Streifen entweder mit einem Radio-papierchromatographen ausgemessen oder mit folgendem Diazoreagenz besprüht: Kurz vor Gebrauch wurden 1 Teil einer 0,5 % Natriumnitritlösung und 2 Teile einer 0,25 % p-Chlor-anilin-Lösung (0,3n HCl) bei 0° gemischt und zu 15 Teilen 10 % Natriumcarbonatlösung gegeben.

6. Bestimmung der Imidazolylmilchsäure in den Extrakten und den Eluaten.

Die Bestimmung der Imidazolylmilchsäure in Lösung erfolgte nach dem Verfahren von Edlbacher et al.⁽¹⁰⁾ 1 ml der Analysenlösung wurde mit 5 ml 0,53 % Natriumcarbonatlösung versetzt und auf 0° abgekühlt. Danach wurden 0,5 ml eines Diazoreagenz zugegeben und exakt 3 Minuten einwirken gelassen. Der entstehende Farbstoff wurde mit 10 ml n-Butanol extrahiert und die optische Dichte des Butanol-Extraktes bei 436 mμ in 1 cm Küvetten bestimmt. Das Diazoreagenz setzt sich aus 1 Teil 0,5 % Natriumnitritlösung und 2 Teilen 0,25 % p-Chlor-anilinlösung in 0,3-HCl zusammen. Abb. 6 zeigt eine Eichkurve, die mit verschiedenen Mengen inaktiver Imidazolylmilchsäure angefertigt wurde.

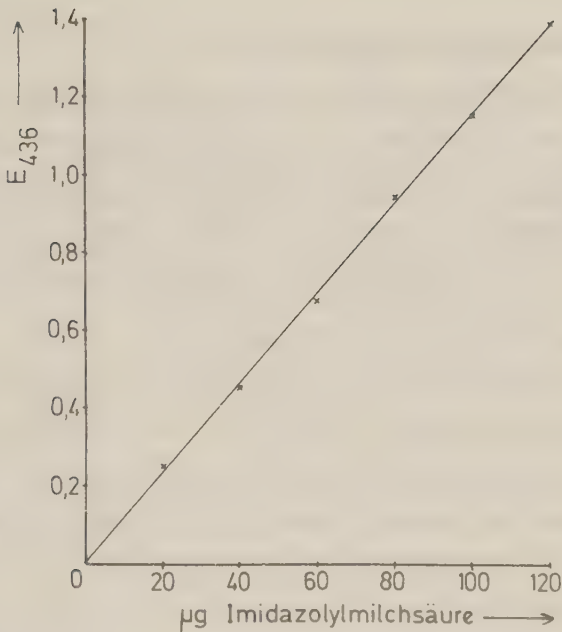


Abb. 6

7. Radioaktivitätsbestimmungen.

a) Flüssig-Szintillations-Spektrometrie.

Die Radioaktivität der aus Papier eluierten Imidazolderivate wurde im Flüssig-Szintillations-Spektrometer (Tri-Carb-Counter, Packard) unter Einsatz interner Standards gemessen. Hierzu wurden je 2 Zählgefäße eingesetzt. Das 1. Gefäß enthielt: 1 ml Versuchslösung, 20 ml Szintillatorlösung und 1 ml Toluol. Die Szintillatorlösung setzte sich aus 600 ml einer Lösung von 4 g PPO und 0,15 g Dimethyl-POPOP in 1000 ml Toluol und 400 ml absoluten Alkohol zusammen.

b) Radiopapierchromatographie.

Die Radiopapierchromatogramme wurden mit einem Radiopapierchromatographen der Firma Friesseke & Höpfner, Erlangen, ausgemessen. Die Fleckenaktivitäten wurden automatisch registriert. Der Einsatz von (2-Ring-¹⁴C) Imidazolyl- (4 bzw. 5)-milchsäure war erforderlich, um auch Metabolite mit geöffnetem Imidazolring zu erfassen.

B. Ergebnisse.

1. In-vitro-Versuche.

1. Versuch: Zunächst wurde ein Versuch durchgeführt um festzustellen, ob im Lebergewebe unmittelbar oder nach 120 Minuten Inkubation diazopositive Imidazolderivate in Erscheinung treten. Es wurde hierbei also keine Imidazolylmilchsäure zugesetzt. Die hierbei verwendeten Lebermengen betrugen etwa 0,25 g pro Ansatz. Bei der beschriebenen Aufarbeitung traten keine diazopositiven Substanzen auf. Dieser Versuch war als Minuskontrolle notwendig, um bei späteren Inkubationsversuchen entscheiden zu können, ob etwa auftretende diazopositive Substanzen aus zugesetzter Imidazolylmilchsäure entstanden sind oder im verwendeten Gewebe unmittelbar vorhanden waren.

2. Versuch: Etwa 2 g Leber wurden in 4 möglichst gleiche Portionen aufgeteilt, ausgewogen und für den Inkubations-Versuch eingesetzt.

1. Ansatz: Ohne Imidazolylmilchsäure:

0 Min. inkubiert;

0,5602 g; Extinktion 0,246.

2. Ansatz: Ohne Imidazolylmilchsäure;

120 Min. inkubiert; 0,4802 g;

Extinktion 0,431.

3. Ansatz: Mit Imidazolylmilchsäure

(100 µg in 1 ml m/15 Phosphatpuffer pH 7,2, dazu 2 ml Schnittsuspension in Puffer); 0 Min.

inkubiert; Extinktion 1,56.

4. Ansatz: Mit Imidazolylmilchsäure

(s.3.Ansatz); 120 Minuten

inkubiert; Extinktion 0,97.

Die Differenzen der Extinktionen betragen zwischen 1. und 3.

Ansatz 1,31 (0 Min.) und zwischen 2. und 4. Ansatz 0,54 (120 Min.)

Nach 120 Minuten Inkubationszeit ist also der Extinktionsanteil, der auf Imidazolylmilchsäure zurückzuführen ist, wesentlich kleiner als der bei den 0 Min. Versuchen.

Es muß also ein Abbau von Imidazolylmilchsäure stattgefunden haben.

Es ist unwahrscheinlich, daß dieser Effekt dadurch zustande gekommen ist, daß während der 120 Minuten der Inkubation zunehmende Mengen von Imidazolylmilchsäure an die Proteine adsorbiert worden sind. Bei früheren Versuchen mit Imidazolylessigsäure war keine Abnahme der Extinktion beobachtet worden. Ein Adsorptionseffekt müßte wegen der chemischen Verwandtschaft nicht nur bei der Imidazolylmilchsäure, sondern auch bei der Imidazolylessigsäure auftreten.

Die Tatsache, daß auch zwischen den Ansätzen 2/1 eine Differenz der Extinktion auftritt ($0,431 - 0,246 = 0,185$) führen wir darauf zurück, daß während der Inkubationszeit von 120 Min. durch restliche Proteasenaktivität etwas L-Histidin freigesetzt wurde.

3. Versuch: Dieser Versuch stellt eine Wiederholung des vorherigen Versuches dar. Es wurde nur etwa der siebente Teil an Lebergewebe eingesetzt. Diese Gewebemenge war bereits zu klein, um einen signifikanten Abbaueffekt zu erkennen.

4. Versuch: Unter gleichen Bedingungen wie beim 2. Versuch wurde ein Versuch mit 1 g Lebergewebe pro Ansatz durchgeführt. Die Differenzen der Extinktion zwischen Ansätzen 4/2 betrugen hierbei 0,297, die der Ansätze 3/1 0,475.

Wiederum trat also deutlich ein Schwund von Imidazolylmilch-säure auf.

Die wässrige Phase des 4. Ansatzes (Ansatz mit Imidazolylmilch-säure, 120 Min. Inkubation) wurde säulen- und papierchromatographisch verarbeitet, wie im methodischen Teil beschrieben wurde. Es traten keine neuen diazopositiven Substanzen auf. Das wäre auch ein Widerspruch gewesen, da die Gesamt-Extinktion für die Diazoverbindungen abgesunken ist.

5. Versuch: Um festzustellen, ob bei den vorherigen Versuchen nicht diazopositive Metabolite entstanden sind, wurde unter gleichen Versuchsbedingungen ^{14}C -Imidazolylmilchsäure eingesetzt.

Bedingungen: 500 mg Lebergewebe (Schnitte) wurden in 1 ml m/15 Phosphatpuffer pH 7,2 suspendiert. Diese Suspension enthielt 100 µg inaktive Imidazolylmilchsäure und 32 nc (Nanocurie) ^{14}C -Imidazolylmilchsäure (in 0,1 ml Puffer zugegeben) mit einer spezifischen Aktivität von 21 µc/m Mol (21 µc/154 mg). Die Menge der ^{14}C -Imidazolylmilchsäure betrug also 235 µg. Das heißt, bei diesen Ansätzen lag eine tatsächliche Menge von 335 µg Imidazolylmilchsäure vor.

Nach 120 Min. Inkubation wurde 10 Min. auf 100° erhitzt und bei 1800 Umdrehungen pro Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde unmittelbar papierchromatographiert. Es wurden 2 Systeme verwendet:

1. Butanol/Wasser/Eisessig
4:5:1 (Partridge-Gemisch).
2. Propanol/Ammoniak/Wasser
8:1:1

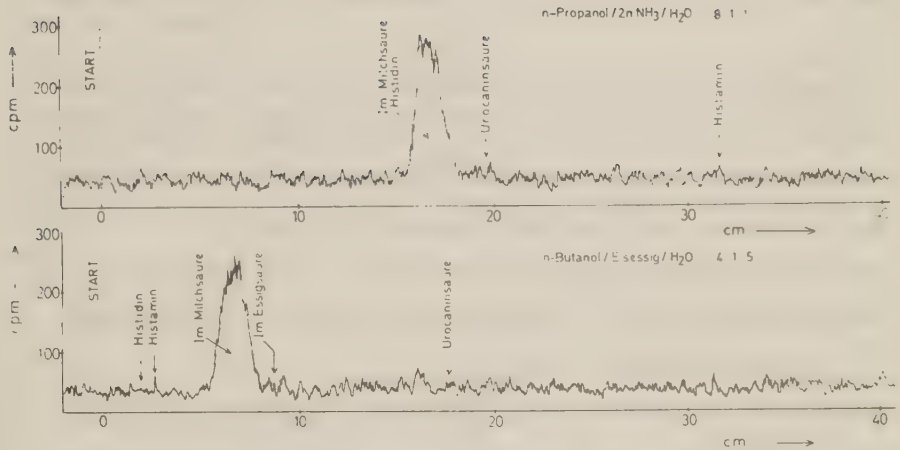


Abb. 7

Die Chromatogramme wurden mit einem Radiopapierchromatographen ausgemessen. Abb. 7 zeigt das Ergebnis. Es tritt nur eine radioaktive Zone auf, die exakt mit der Standard-Imidazolylmilchsäure übereinstimmt. Dieses Ergebnis steht in Widerspruch mit der Tatsache eines Imidazolylmilchsäureabbaus. Es bleibt als einzige Klärung vorläufig übrig, daß aus der radioaktiven Imidazolylmilchsäure eine sehr flüchtige Substanz entstanden ist, die bei der Aufarbeitung verloren ging.

Hierbei drängt sich der Gedanke auf, daß während der Inkubation der Ring gespalten und die flüchtige Ameisensäure freigesetzt wurde. Diese Vorstellung würde mit allen Beobachtungen der Versuche 1-6 vereinbar sein.

In diesem Versuch würde es bedeuten, daß ^{14}C -Ameisensäure entwichen und ein inaktiver Metabolit übrig geblieben wäre, der sich mit dem Radiopapierchromatographen nicht nachweisen läßt.

6. Versuch: Dieser Versuch wurde unter denselben Bedingungen wie der 5. Versuch durchgeführt. Die eingewogene Lebermenge betrug jedoch 1.006 g (doppelte Menge wie in vorigem Versuch), die Inkubationszeit 180 Min. anstatt 120 Min.

Der Versuch hatte den Zweck festzustellen, ob bei dem beobachteten Abbau der ^{14}C -Imidazolylmilchsäure eine flüchtige ^{14}C -haltige Substanz auftritt.

Am Ende der Inkubation wurde der Ansatz wie üblich gekocht und zentrifugiert. Nun wurde der Überstand bei gewöhnlichem Druck destilliert, wobei besonders sorgfältig darauf geachtet wurde, daß kein Material von dem Destillations-Kolben in die Vorlage hinüberspritzte. Das Destillat wurde erneut destilliert. Anschließend wurde auf Radioaktivität im Flüssig-Szintillation-Spektrometer geprüft. Das Destillat wies eine beachtliche Radioaktivität auf: 47,000 cpm pro 1 ml Vorlage. Die gesamte Menge der Vorlage betrug 6,4 ml (bei der Destillation war mit Wasser verdünnt worden). Umrechnung ergibt, daß etwa ein Drittel der ^{14}C -Aktivität in die Vorlage übergang.

Wegen der Flüchtigkeit des radioaktiven Abbauproduktes war es nicht möglich, durch einfache Radiopapierchromatographie die Identität zu bestimmen. Das Destillat selbst zeigte keine diazopositive Farbreaktion.

Es ist wahrscheinlich, daß es sich bei den Abbauprodukten um Ameisensäure handelt. Die ^{14}C -Imidazolylmilchsäure enthält lediglich am C-Atom des Ringes ^{14}C -Aktivität. Hieraus kann ^{14}C -Ameisensäure entstehen, die flüchtig und nicht diazopositiv ist. Es ist verständlich, daß das zurückbleibende Produkt nicht erfaßt werden kann, weil es weder radioaktiv (einziges ^{14}C -Atom entfernt) noch diazopositiv (Imidazolylmilchsäure-Ring zerstört) ist.

2. In vivo-Versuche

1. Versuch: Zunächst war bei den in-vivo-Versuchen erforderlich zu überprüfen, ob auch ohne Injektion von Imidazolylmilchsäure in den einzelnen säulen- und papierchromatographischen Fraktionen diazopositive Substanten auftreten. Das war nicht der Fall. Lediglich bei der Leber lassen sich Spuren von L-Histidin in der 1. Fraktion der Dowex 1 x 8 Säule (30 ml Wasser, basische und neutrale Substanten) feststellen.

2. Versuch: In eine 22 Tage alte, 55 g schwere, männliche Ratte wurden 27,5 mg Imidazolylmilchsäure in 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert. Nach 20 Min. wurde die Ratte dekapitiert und das Blut in einem Zentrifugenglas aufgefangen, dessen Wände mit Liquemin (Heparin) benetzt worden waren, um die Gerinnung zu hemmen. Das Blut wurde mit 20 ml Wasser verdünnt, unter Rückfluß 10 Min. gekocht und bei 20.000 Umdrehungen pro Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde säulenchromatographisch verarbeitet.

Leber und Niere wurden entnommen, im Gefriermikroton geschnitten und ebenfalls wie bei den in-vitro-Versuchen aufgearbeitet.

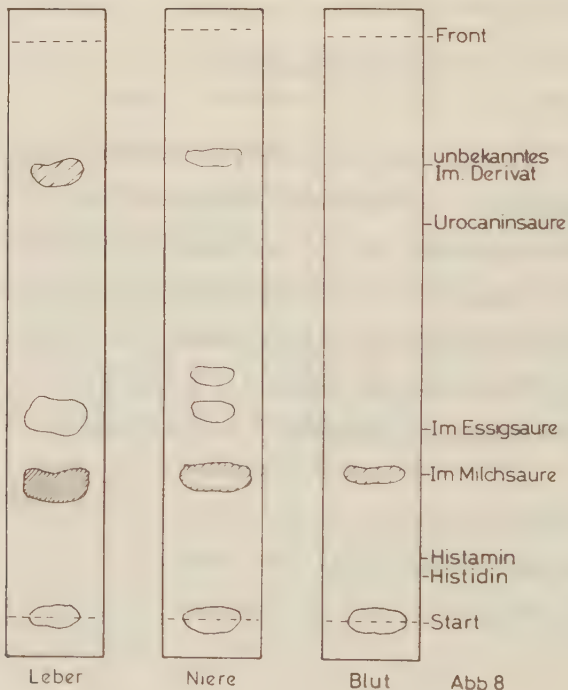


Abb 8

Bei allen 3 Organen (s. Abb. 8) tritt lediglich in der 2. Fraktion der Dowex 1 x 8-Säule (n-Essigsäure) unveränderte Imidazolylmilchsäure auf, am meisten in der Leber, am wenigsten im Blut. Im Falle der Leber kann man bei papierchromatographischer Trennung der 2. Säulen-Fraktion mit Partridge-Gemisch noch eine schwach diazopositive Zone mit einem Rf-Wert von 0,7 beobachten.

Dieser Versuch beweist, daß Imidazolylmilchsäure während eines Aufenthaltes von 20 Min. im Rattenorganismus praktisch zu keinem anderen diazopositiven Produkt abgebaut wird. Diese Aussage ist gleichbedeutend mit der Feststellung, daß die Imidazolylmilchsäure im Rattenkörper nur sehr schwach an der Seitenkette angegriffen wird. Der Versuch wurde mit gleichem Ergebnis wiederholt.

3. Versuch: Dieser Versuch sollte klären, welche Natur die schwach diazopositive Substanz besitzt, die 20 Min. nach Injektion von Imidazolylmilchsäure in der Leber auftritt und sich gemeinsam mit Imidazolylmilchsäure in der 2. Fraktion befindet (großer Rf-Wert bei papierchromatographischer Trennung mit Partridge-Gemisch).

Eingesetzt wurde eine 22 Tage alte, 60 g schwere, männliche Ratte. Die Aufarbeitung der Leber erfolgte wie beim 2. Versuch 20 Min. nach Injektion von Imidazolylmilchsäure. Dreimal je 100 µl der auf 0,5 eingeengten 2. Säulen-Fraktion (eingedampft und in 0,5 ml 0,1 n HCl aufgenommen) wurden 18 Stunden mit Partridge-Gemisch papierchromatographiert. Ein Streifen wurde mit Diazoreagenz besprüht, um die Lage der schwach

diazopositiven Substanz zu erfassen. Die zugehörigen Zonen wurden aus den beiden anderen Streifen herausgeschnitten und 30 Min. bei 80° mit zweimal je 10 ml Wasser extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden eingedampft und für die Chromatographie in 0,1 ml Wasser aufgenommen. Mit dieser Lösung wurden 3 Papierchromatogramme (Partridge-Gemisch) angefertigt (S. Abb. '9):

- (a) Auf 2 getrennten Bahnen wurden 10λ des Extrakts und 10λ von einem Imidazolylmilchsäure-Standard (μg pro pl) eingesetzt. Die Bahn mit Extrakt zeigte eine sehr schwache diazopositive Substanz, die etwas weitergewandert war als die Imidazolylmilchsäure auf der anderen Bahn.
- (b) 50λ des Extraktes wurden allein chromatographiert. Nach Besprühen zeigte sich die schwach diazopositive Substanz wie bei Chromatogramm (a).
- (c) Außerdem wurde ein Mischchromatogramm angefertigt. 30λ des Extraktes wurden hierzu mit 30λ des Imidazolylmilchsäure-Standards vermischt. Besprühen mit Diazo-reagenz ergab einen einzigen diazopositiven Fleck mit dem Rf-Wert der Imidazolylmilchsäure.

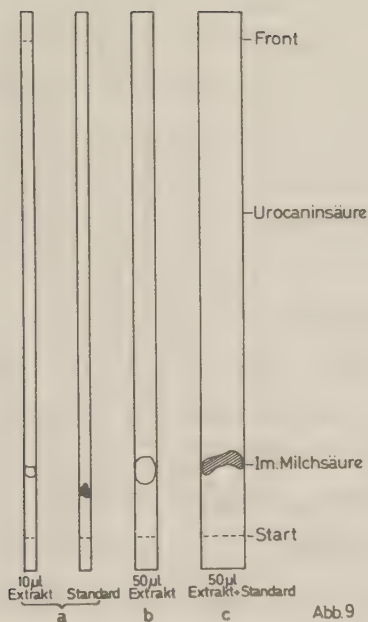


Abb. 9

Dieser Versuch beweist, daß es sich bei dem schwach diazopositiven Produkt, das im Papierchromatogramm (Partridge-Gemisch) der 2. Säulen-Fraktion des Leberextraktes auftritt, um eine Substanz handeln muß, bei der die Imidazolylmilchsäure nur locker mit einer anderen Substanz konjugiert ist. Dieses Konjugat läßt sich bereits durch Erwärmen mit Wasser zersetzen, so daß bei Rechromatographie die Imidazolylmilchsäure wieder in Erscheinung tritt.

4. Versuch: Dieser Versuch hatte das Ziel festzustellen, welche unpolare Substanz bei den 20 Min. Versuchen aus Imidazolylmilchsäure in der Rattenleber entstanden sein könnte.

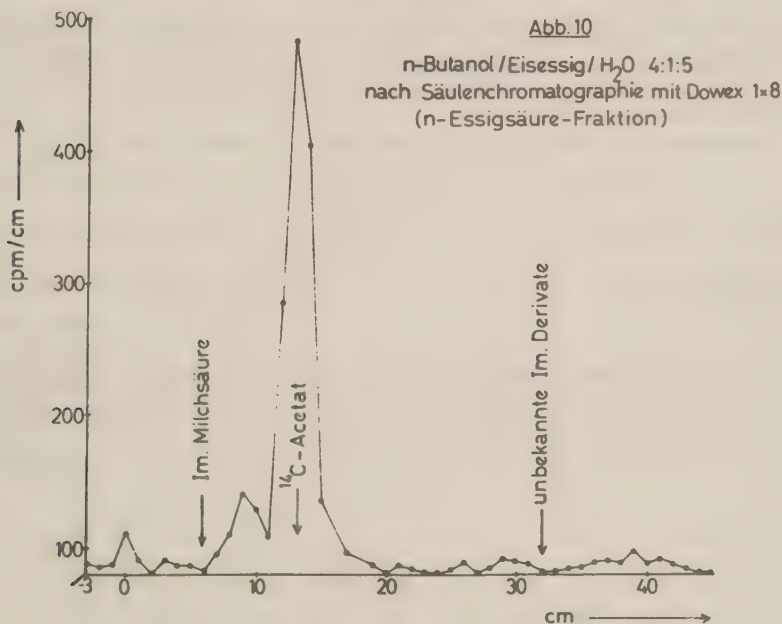
Beim vorherigen Versuch wurde schon erwähnt, daß es sich bei dieser unpolaren Verbindung um ein leicht verseifbares Konjugat der Imidazolylmilchsäure handeln muß. Es können einige Voraussetzungen gemacht werden, welche Partner der Imidazolylmilchsäure infrage kommen. Es muß eine einfache Substanz sein, die keine zusätzliche funktionelle Gruppe besitzt, andernfalls müßte das Konjugat einen wesentlich kleineren Rf-Wert haben. Ausserdem muß die Verbindung eine Säure sein, weil sie in der Säurefraktion aus der Säule tritt. Es ist also unwahrscheinlich, daß die Carboxylgruppe der Imidazolylmilchsäure substituiert ist. Als Bindungsort bleiben daher die Iminogruppe des Imidazolringes und die Hydroxygruppe der Seitenkette übrig. Die Iminogruppe kommt nicht infrage, da eine Besetzung dieser Gruppe die beobachtete diazopositive Farbreaktion verhindern würde. Am wahrscheinlichsten ist daher, daß es sich bei dem Konjugat um ein O-Acetat der Imidazolylmilchsäure handelt. Um dieses zu überprüfen, wurde der 3. Versuch wiederholt, jedoch gleichzeitig ^{14}C -Natriumacetat gemeinsam mit der Imidazolylmilchsäure injiziert.

Die Injektionslösung wurde wie folgt zubereitet:

30 mg Imidazolylmilchsäure wurden in 0,5 ml Wasser gelöst und hierzu 0,25 ml ^{14}C -Natriumacetat-Lösung (0,1n HCl) zugegeben. Die 0,25 ml mit ^{14}C -Natriumacetat wurden einer Stammlösung von 100 μC ^{14}C -Natriumacetat in 1 ml n HCl entnommen. Die Injektionslösung enthielt also 25 μC Natriumacetat. Vor der Injektion wurde das Gemisch mit 2 n NaOH auf pH 8 eingestellt.

20 Min. nach subcutaner Injektion der Lösung in eine 60 g schwere Ratte erfolgte Dekapitierung und Entnahme von Blut, Niere und Leber wie bei den früheren Versuchen.

Hier sei nur auf das Ergebnis mit Leber eingegangen, da lediglich in diesem Organ das erwähnte diazopositive Konjugat auftrat. Wie bei den früheren Versuchen wurde der Rückstand der 2. Säulenfraktion (Dowex 1 x 8, 1 n Essigsäure) in 0,5 ml 0,1 n HCl aufgenommen und je 100 μ l auf 2 Bahnen mit Partridge-Gemisch und ebenfalls je 100 μ l auf 2 anderen Bahnen mit Propanol-Ammoniak papierchromatographiert. Bei beiden Gemischen diente die eine Bahn für die Radiopapierchromatographie, die andere Bahn zum Besprühen mit Diazoreagenz. Da auf den Chromatogrammen mit Propanol-Ammoniak das Konjugat nicht zu erkennen war, sei hier lediglich eine Abbildung der Chromatogramme mit Partridge-Gemisch wiedergegeben (Abb.10).



Man erkennt in Abb. 10, daß in dem Bereich, in dem das Konjugat auftritt, keine Radioaktivität nachgewiesen werden konnte. Das gilt nicht nur für die Radioaktivitätsmessung am "Scanner", sondern auch für die sehr viel empfindlichere Radioaktivitätsmessung im "Flüssig-Szintillations-Spektrometer".

5. Versuch: Da im vorigen Versuch keine Radioaktivität im Bereich des Konjugates auf dem Papierchromatogramm zu finden war, wurde der 4. Versuch mit der dreifachen ^{14}C -Aktivität wiederholt (75 μC anstelle von 25 μC ^{14}C -Natriumacetat). Wie Abb. 11 zeigt, ist an der Stelle des Konjugates nun tatsächlich eine kleine ^{14}C -Aktivität zu erkennen. Allerdings mußte wiederum das "Flüssig-Szintillations-Spektrometer" zu Hilfe genommen werden. Das Ergebnis spricht dafür, daß es sich bei unserem Konjugat tatsächlich um ein O-Acetat der Imidazolylmilchsäure handelt.

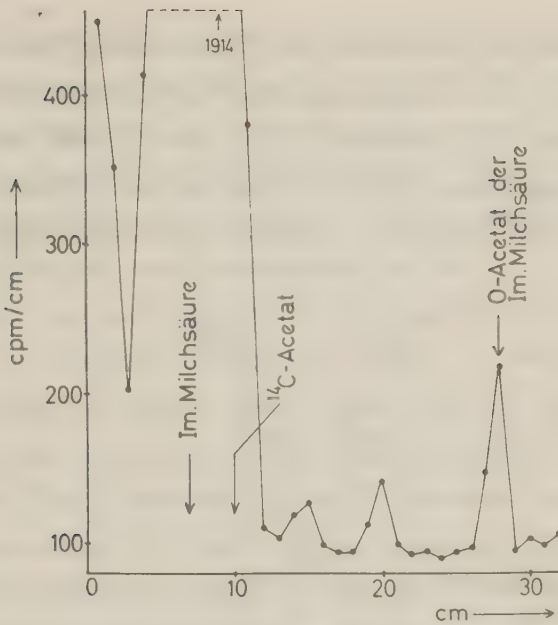


Abb. 11

6. Versuch: Dieser Versuch entspricht dem 2. Versuch, jedoch betrug die Zeit von Injektion der Imidazolylmilchsäure bis zur Tötung des Tieres 90 Min. Das Gewicht der eingesetzten Ratte betrug 65 g, das Alter 20 Tage. Lediglich die Leber wurde aufgearbeitet. Nach 90 Min. trat in der Leber als diazopositive Substanz ausschließlich unveränderte Imidazolylmilchsäure auf.

7. Versuch: Dieser Versuch ist eine Wiederholung des 6. Versuches (90 Min.), jedoch wurden Leber, Niere und Blut verarbeitet.

Die 40 Tage alte Ratte wog 100 g. Die beiden Säulenfraktionen (30 ml Wasser und 30 ml 1 n-Essigsäure) wurden eingedampft und die Rückstände in 0,5 ml 0,1 N-HCl aufgenommen. Bei der Chromatographie mit Partridge-Gemisch wurden von der 1. Fraktion 10 μ c und von der 2. Fraktion 100 μ c eingesetzt.

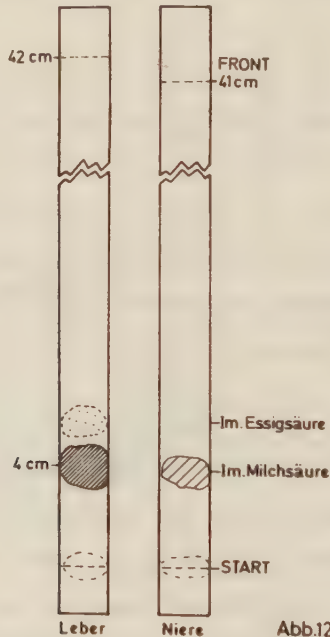


Abb.12

Abb.12 läßt erkennen, daß in der 2.Fraktion nur Imidazolylmilchsäure auftritt. In der 1.Fraktion liegt als diazopositive Substanz nur etwas Histidin vor. Das gilt für Leber und Niere, dagegen praktisch nicht für Blut.

Die Histidinmenge die bei der Leber in Erscheinung tritt, ist möglicherweise etwas größer als die beim Kontroll-Versuch (1. in-vivo-Versuch). Das würde für eine Umwandlung von Imidazolylmilchsäure in Histidin sprechen. Diese Frage kann aber bei Einsatz von inaktiver Imidazolylmilchsäure, wie in diesem Versuch, nicht beantwortet werden.

8. Versuch: In eine 25 Tage alte, 64 g schwere Ratte wurden 26,4 mg ^{14}C -Imidazolylmilchsäure, gelöst in 1 ml Wasser, intraperitoneal injiziert. Nach 90 Min. erfolgte Dekapitierung. Lediglich die Leber wurde verarbeitet. Die beiden Fraktionen wurden wiederum eingedampft und die Rückstände in 0,5 ml 0,1 HCl aufgenommen. Von jeder Fraktion wurden mit je 100 μC 2 Papierchromatogramme angefertigt. Hiervon wurde das eine mit Diazoreagenz besprüht und das andere im Radiopapierchromatographen ausgemessen (Abb. 13).

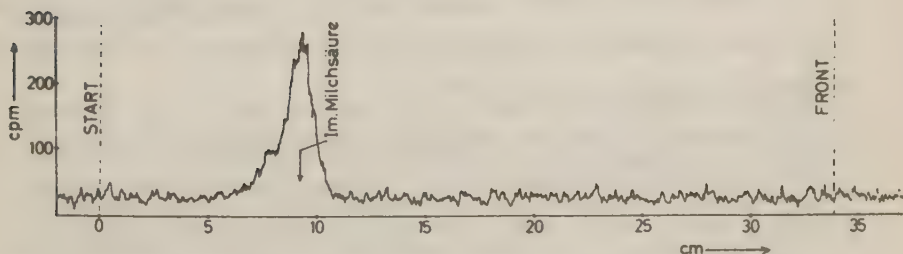


Abb.13

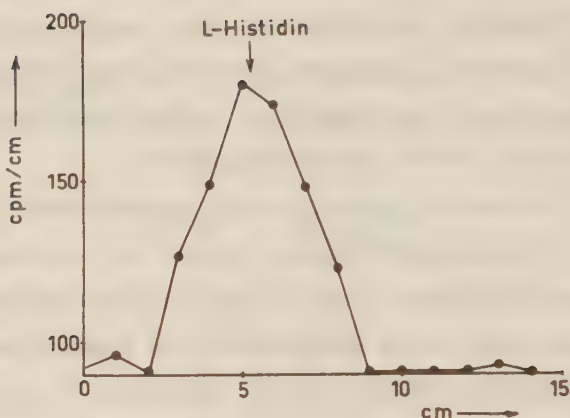


Abb.14

Das Radiopapierchromatogramm des Eluats mit Wasser (Säulenchromatogramm) zeigte bei L-Histidin eine schwach radioaktive Zone, die allerdings nur bei Ausmessen im "Flüssig-Szintillation-Spektrometer" erfaßt werden konnte. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß Imidazolylmilchsäure in kleinem Umfang in L-Histidin umgewandelt werden kann.(Abb.14).

Die N-Essigsäure-Fraktion enthielt ausschließlich ¹⁴C-Imidazolylmilchsäure, (Abb.15). Der beim 30 Min. Versuch in der Leber aufgetretene, wenig polare Peak, den wir als O-Acetat-Imidazolylmilchsäure angesprochen haben, war auch bei diesem 90 Min. Versuch festzustellen.

9. Versuch: Dieser letzte Versuch diente dazu festzustellen, ob Imidazolylmilchsäure tatsächlich in L-Histidin umgewandelt werden kann. Im vorherigen Versuch hatte sich gezeigt, daß 90 Min. nach intraperitonealer Injektion von ^{14}C -Imidazolylmilchsäure offensichtlich eine kleine Menge von freiem ^{14}C -Histidin in der Leber auftritt. Da freies Histidin schnell abgebaut wird, ist es verständlich, daß nach Injektion von ^{14}C -Imidazolylmilchsäure nur wenig Aktivität an freiem ^{14}C -Histidin auftreten kann. Da ein Teil des aus Imidazolylmilchsäure entstandenen Histidins in die Organproteine eintreten muß, haben wir bei diesem Versuch 90 Min. nach Injektion von 26,6 mg ^{14}C -Imidazolylmilchsäure die Proteine der Leber und Adduktoren-Muskulatur isoliert und hydrolysiert. Hierzu wurden je ca. 5 mg der Organproteine 17 Stunden bei 110° in 6N-HCl (Bombenrohr) hydrolysiert, nach Eindampfen in 2 ml 2N-HCl aufgenommen und auf eine Säule mit Amberlite CG 120 (1 cm x 15 cm, 200-400 mesh, äquilibriert mit 2N-HCl) aufgesetzt. Entwickelt wurde mit 2N-HCl. Die Fraktionen 120-150 ml enthielten das L-Histidin (Diazo-Test).

Tabelle 1: ^{14}C -Aktivitäten (cpm) in den L-Histidinfraktionen und Nachbarfraktionen der Hydrolysate von Leber- und Muskelproteinen 90 Min. nach Injektion von 26,6 mg ^{14}C -Imidazolylmilchsäure in eine 30 Tage alte, männliche Sprague-Dawley-Ratte.

	L-Histidinfraktion	Nachbarfraktion
Muskelproteine	76	12
Leberproteine	276	12

Die Tabelle 1 zeigt, daß in Muskel und Leber das proteingebundene L-Histidin radioaktiv ist. Der Säugetierorganismus ist also tatsächlich in der Lage, Imidazolylmilchsäure zum Teil in L-Histidin zu überführen. Die Tatsache, daß die Radioaktivität im Muskelprotein kleiner ist als im Leberprotein ist verständlich, da die biologische Halbwertszeit der Leberproteine wesentlich kleiner ist als die der Muskelproteine. Die Leberproteine sind also in der Lage, viel schneller inaktive Histidinmoleküle gegen radioaktive auszutauschen als die Muskelproteine.

C. Discussion der Ergebnisse:

Bei Beginn unserer Versuche war völlig offen, ob und in welchem Umfange Imidazolylmilchsäure abgebaut wird. Das gilt besonders für die in-vivo-Versuche. Deshalb sei zunächst auf diese eingegangen.

Wir fanden, daß die Imidazolylmilchsäure hierbei sehr stabil ist. Diese Stabilität ist vom biochemischen Standpunkt aus etwas enttäuschend. Es standen eine Reihe von Referenz-Substanzen zur Verfügung, die nicht zur Klärung und Identifizierung von Metaboliten eingesetzt werden brauchten.

Diese Stabilität der Imidazolylmilchsäure ist an sich verständlich. Unter den Ausscheidungsprodukten überwiegen in der Regel weitgehend reduzierte Metabolite. Das gilt für verschiedene Stoffklassen, nicht nur für die Aminosäuren. Es sei hier an den Abbau des Blutfarbstoffes und an die Metabolisierung von Steroidhormonen erinnert. So kann man sich auch von Imidazolylmilchsäure keinen Metaboliten vorstellen, der einen stärkeren Reduktionsgrad besitzt. Es sei darauf hingewiesen, daß auch bei anderen aromatischen Aminosäuren Milchsäurederivate auftreten. Trotzdem ist anzunehmen, daß im Organismus eine kleine Menge Imidazolylbrenztraubensäure entsteht. Andernfalls wäre nicht zu verstehen, daß sowohl in freier Form, als auch in proteingebundener Form ¹⁴C-Histidin auftritt, wenn man ¹⁴C-Imidazolylmilchsäure injiziert. Es ist nicht verwunderlich, daß wir keine Imidazolylbrenztraubensäure gefunden

haben, weil auch nur sehr wenig Histidin, gebildet aus Imidazolylmilchsäure, in Erscheinung tritt.

Von gewissem Interesse ist das Auftreten eines unpolaren Metaboliten, den wir für O-Acetyl-Imidazolylmilchsäure halten. Uns ist kein Parallelfall bekannt, Anscheinend sind bisher weder von der Hydroxyphenylmilchsäure noch von der Hydroxyindolylmilchsäure O-Acetyl-derivate gefunden worden.

Vom klinisch-chemischen Standpunkt ist die Stabilität der Imidazolylmilchsäure erfreulich. Sie stammt, wie im theoretischen Teil beschrieben wurde, aus dem 3. Abbauweg des Histidins, der mit einer Transaminasenreaktion beginnt und zu Imidazolylbrenztraubensäure führt. Aus der Imidazolylbrenztraubensäure wird dann Imidazolylmilchsäure. Diese Reduktion ist offensichtlich kaum umkehrbar. Diese Feststellung ist ein unmittelbares Ergebnis der vorliegenden Arbeit. Daher eignet sich die Imidazolylmilchsäure ausgezeichnet als klinisch-chemische Testsubstanz. In unserer Abteilung wird von dieser Erkenntnis bereits Gebrauch gemacht. Die Konzentrationen von Imidazolylmilchsäure im Urin gesunder Personen werden systematisch verglichen mit denen im Urin von Allergikern, Nervenkranken und endokrinisch Erkrankten. Ich erwähnte schon, daß bei solchen Erkrankungen mit Anomalien im Stoffwechsel der biogenen Imidazolderivate Histidin und Histamin gerechnet werden muß. Auch Frauenkrankheiten werden seit einiger Zeit berücksichtigt. Es ist seit langem bekannt, daß während der Schwangerschaft ein vom Normalen abweichender Histidinstoff-

wechsel vorliegt.

Bei den in-vitro-Versuchen wurde mit Leberschnitten ein Abbau der Imidazolylmilchsäure vorgefunden, bei dem allerdings keine diazopositiven Mtabolite auftreten. Anscheinend wird der Ring gespalten, wobei Ameisensäure entsteht. Bei Einsatz von ^{14}C -Imidazolylmilchsäure im Rahmen der in-vitro-Versuche trat ein leicht flüchtiges radioaktives Abbauprodukt auf, das wir für ^{14}C -Ameisensäure halten. Es sei nochmals daran erinnert, daß unsere ^{14}C -Imidazolylmilchsäure am C-2-Atom des Ringes markiert war. Diese Ringspaltung macht eine weitere Arbeit erforderlich, für die eine anders markierte Imidazolylmilchsäure erst hergestellt werden muß. Immerhin ist schon bei den jetzigen Ergebnissen von Interesse, daß erstmalig Ringspaltung eines Imidazolderivates im Säugetierorganismus außer der bei Histidin wahrscheinlich gemacht werden konnte. Lediglich bei Imidazolylessigsäure ist eine Ringspaltung durch Mikroorganismen bekannt.

ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe von in-vivo- und in-vitro-Versuchen wurde der Abbau von Imidazolylmilchsäure in 30 Tage alten, männlichen Sprague-Dawley-Ratten studiert. Einsatz von inaktiver und (Ring-2- ^{14}C) Imidazolylmilchsäure bei in-vivo-Versuchen führte zur Erkenntnis, daß Imidazolylmilchsäure eine sehr Stoffwechsel-stabile Substanz ist und sich daher als klinisch-chemische Testsubstanz eignet.

30 und 90 Min. nach intraperitonealer Injektion trat in Leber, Niere und Blut fast ausschließlich nicht umgesetzte Imidazolylmilchsäure auf. Lediglich in der Leber konnte bei den Versuchen mit dem radioaktiv markierten Ausgangsprodukt etwas ^{14}C -Histidin gefunden werden. Außerdem trat in sehr kleinen Mengen ein niederpolarer diazopositiver Metabolit auf, der sich bei Hydrolyse mit Wasser bei 100°C als Konjugat der Imidazolylmilchsäure erwies. Nach gleichzeitiger Injektion von inaktiver Imidazolylmilchsäure und ^{14}C -Essigsäure zeigte der erwähnte Metabolit ^{14}C -Aktivität. Es ist daher anzunehmen, daß bei den in-vivo-Versuchen O-Acetyl-Imidazolylmilchsäure auftritt.

90 Min. nach Injektion von ^{14}C -Imidazolylmilchsäure wurde in den Proteinen der Leber und der Adduktoren-Muskulatur ^{14}C -Histidin nachgewiesen (Isolierung der Proteine, Hydrolyse, säulen-chromatographische Trennung der Aminosäuren). Damit wurde die im Zusammenhang mit Ernährungs- und Wachstums-Versuchen vor 40 Jah-

ren geäußerte Vermutung, daß aus Imidazolylmilchsäure Histidin entstehen kann, biochemisch bewiesen.

Bei in-vitro-Versuchen mit ^{14}C -Imidazolylmilchsäure und Leberschnitten trat ein sehr flüchtiges Abbauprodukt auf, bei dem es sich möglicherweise um ^{14}C -Ameisensäure handelt. Die damit nahegelegte Aufspaltung des Imidazolringes bedarf einer eigenen, gründlichen Arbeit.

Literaturnachweis

1. Auerbach, V.H., George, A.M.D., Baldrige, R.C., Tourtelotte, C.D., Brigham, M.P., J. Pediat. 60, 487 (1962). (26.)
2. Baldrige, R.C. und C.D. Tourtelotte, J. Biol. Chem. 233, 125, (1958) u. 7 (9)
3. Baldrige, R.C. und V.H. Auerbach, J. Biol.Chem. 239, 1557, (1967) (25)
4. Celander, D.R. und C.P. Berg, J. Biol.Chem. 202, 351, (1953) (s. 6 u. 7) (8)
5. Cerqua, S., Minerva Med. (Torino) 1, 542 (1936) (22)
6. Cox, G.K. und Ross, J. Biol.Chem.68, 769, (1926) (3)
7. Cox, G.K. und Ross, J. Biol.Chem.68, 781, (1926) (4)
8. Dubovsky, J. und E. Dubovsky, Clin.Chem.Acta, 12, 360, (1965)
E. Benjamin-Austin, Dissertation, Bonn, 1965. (10)
9. Edlbacher, S., Zeitschrift f. Physiol. Chem. 157, 106, (1926) (11)
10. Edlbacher, S., Bauer H., Stähelin H.R. und Zeller A.,
Hoppe Seyler's Ztschr. f. physiol. Chemie 270, 158 (1941) (+)
11. Fränkel, S., Mh. Chem. 24, 299 (1903) (27)
12. Furth, O., Biol. Zeitschrift, 96, 269, (1919) (16)
13. Greenberg, M.D., Annu.Review Biochem. 33,35, 648 (1964) (12)
14. Hanson, A., Naturwissenschaften, 44, 470-1 (1957) (28)
15. Harrow, B., und C.P. Sherwin, J. Biol. Chem. 70, 683-695, (1926) (5)
16. Herbert, V. und L.W. Sullivan, Proc.Soc.Experim.Biol. and Med. 112, 2, (1963)
17. Holtz, R., Ammon, R. und W. Dirscherl, "Fermente, Hormone, Vitamine" Bd. 11, S. 746, Thieme Verlag, Stuttgart (1960) (14)
18. Kahlson, G., Lancet 1960a 167 (Regenerierende Rattenleber, Hypothese) (15)
19. Kappeller -Adler, R.I., Zeitschrift f. Biochem 264, 131, (1933) (17)
20. Kappeller -Adler, R.I., und F. Haas, Zeitschrift f.Biochem.280 232 (1935) (18)
21. Katz, G., Am. J. Physiology 129, 735, (1940) (21)

22. Knoop, B.Ph.P. 7, 145 (Beilstein 25,187, 1936) (2)
23. Lin, E.C.C., Pitt, B.M., Civin, M. und W.E. Knox, J. Biol. Chem. 233, 668, (1958) (6).
24. Obal, F.L., Keleman, L., Berde, B. und Szöke, A., Acta Med. Hung. 1, 21 (1948).
25. Pyman, J., Soc. 99, 1390, 1401 (1911) (1)
26. Schild, H. und Kawkins, O.F., Lancet 11, 376 (1951) (24)
27. Spolter, P.D. und R.C. Baldrige, J. Biol.Chem. 238, 2071, (1963) (7).
28. Walch, L. und L.V. Kapf, Heidelberg Univ. Frauenklinik Zb. Gynäkologie 73, 1083-1089, (1951), Zb. 122, 3614, (1951) (19)
29. Werle, E., Zeitschrift f. Biochem. 288, 292 (1936) (13)

An dieser Stelle möchte ich Herrn
Prof. Dr. rer. nat. Karl Oskar Mosebach
herzlich danken für die Überlassung des
Themas und die eingehende wissenschaft-
liche Beratung.

Lebenslauf

Ich, Andrew Richard Amar, bin am 15.2.1934 als Sohn des Beamten George William Apenyo und seiner Ehefrau Ajulieri Angom in Amugo (Uganda) geboren.

Von 1943 - 1949 besuchte ich die evangelische Schule - Kalaki Primary School. Von 1949 - 1953 besuchte ich die "Boroboro Junior Secondary School" in Lira. An dieser Schule bestand ich im Jahre 1953 das "Junior Leaving Certificate Examinations."

1954 - 1956 besuchte ich die Makerere College School. Im Jahre 1956 bestand ich an dieser Schule das Cambridge School Certificate.

Von 1957 - 1959 war ich in London als Privat-Student, dort besuchte ich das Regent Polytechnic College.

Von 1959 - 1960 besuchte ich die Moskauer Staatsuniversität als Medizinstudent.

Im Nov. 1960 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Bonn, bestand im Sommersemester 1962 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und im Wintersemester 1963/64 die ärztliche Vorprüfung.

Im November 1967 bestand ich das medizinische Staatsexamen in Bonn.

